

膝蓋下脂肪体に由来する脱分化脂肪細胞の
形質および機能解析（要約）

日本大学大学院医学研究科博士課程
外科系整形外科学専攻

谷本 浩二

修了年 2018 年

指導教員 長岡 正宏

《緒言》

関節軟骨は、血管、神経、リンパ管が存在しない結合組織であり、血行を欠き自己修復能が乏しい^[1]といった特性がある。一旦、軟骨損傷が生じると十分に修復されることなく、変形性膝関節症（Osteoarthritis：膝 OA）が発症^[2]し、進行した結果、関節機能が著しく低下する。軟骨損傷の治療目標は、力学的に優れ、より生体に近い硝子軟骨の修復や再生を促し、長期的に硝子軟骨の機能を維持すること、そして、関節の適合性を回復させ疼痛を除去し、OAの発症を予防することである。軟骨損傷の治療として、近年、軟骨欠損部に人工的に軟骨細胞を導入する方法として、間葉系幹細胞（Mesenchymal Stem Cells：MSC）^[3]移植を始めとした軟骨再生治療が注目されており、治療法の確立が望まれている。その中で、より関節軟骨を構成する硝子軟骨を誘導できる細胞源の選択が求められている。膝蓋下脂肪体（Infrapatellar Fat Pad：IFP）由来の MSC は、良好な軟骨分化能を有している^[4-6]ことが報告されており、膝の手術の際に頻繁に切除され、医療廃棄物として処理されるため、治療用細胞源として利用しやすい組織と考えられている。

《目的》

日本大学医学部細胞再生・移植医学分野教室では、高い増殖能と MSC と同等の多分化能を示す細胞源として脱分化脂肪細胞（Dedifferentiated Fat cell：DFAT）^[7]を用いた軟骨再生治療の樹立を目指している。本研究では、同一 OA 患者から皮下脂肪および膝蓋下脂肪体組織を採取し、各々の DFAT を調製して *in vitro* 下に形質解析および機能解析を行った。

《対象と方法》

1. 対象

日本大学医学部附属板橋病院で人工膝関節置換術施行予定の OA 患者より事前の同意を得た上で、手術時に切除され破棄される予定の皮下脂肪および膝蓋下脂肪体組織の提供を受けた。

2. DFAT 調製方法

皮下脂肪および膝蓋下脂肪体の各々の DFAT は既報に従い調製した^[8]。膝蓋下脂肪体由来 DFAT（IFP-DFAT）および皮下脂肪由来 DFAT（SC-DFAT）は第 2 継代（P2）の細胞を実験に用いた。

3. フローサイトメトリー

培養細胞をトリプシン処理により細胞を回収した後、0.2%ウシ血清アルブミン添加 autoMACS Running Buffer (Miltenyi Biotec) を用いて混濁し、 1×10^6 個/100 μ l に調整した。非特異的結合を阻害するため、10 μ l 正常ウサギ血清 (Sigma-Aldrich, Lot 100M8400) を添加した。autoMACS Running Buffer を用いて洗浄を行い、以下の抗体を 10 μ l 添加した。使用した抗体は、Phycoerythrin (PE) 標識抗ヒト CD73、PE 標識抗ヒト CD34、PE 標識抗ヒト HLA-DR、Allophycocyanin (APC) 標識抗ヒト CD90、APC 標識抗ヒト CD105、APC 標識抗ヒト CD45 (以上 BD Biosciences) を用いた。Isotype control として、Fluorescein isothiocyanate (FITC) または PE 標識抗マウス IgG 抗体 (BD Biosciences) を使用した。細胞表面抗原の測定は、FACS Aria フローサイトメーター (Becton Dickinson) を使用し、Forward scatter (FSC) および Side scatter (SSC) をゲーティング後、7AAD 陰性分画をゲーティングし、生細胞のみを解析した。解析は FlowJo ソフトウェア (Version 9, FlowJo, LLC) を用いて行い、Isotype control の蛍光強度と比較し、ヒストグラムを作成した。

4. 細胞増殖能 (WST-1 アッセイ)

細胞増殖能を評価するための WST-1 アッセイは、Cell Proliferation Reagent WST-1 (Cat. No.5 015944, Sigma Aldrich) を用いて、添付のプロトコールに従って行った。SC-DFAT および IFP-DFAT を 24 ウェルプレート (BD Falcon) に 2,500 個/well の密度で播種し、20% FBS 含有 DMEM で培養した。培養後 2、4、7 日目に、各ウェルの培地を吸引し、Cell Proliferation Reagent WST-1 を 110 μ l ずつ加えた。ブランクとして空のウェルにも同様に、Cell Proliferation Reagent WST-1 を加えた。そして、マイクロプレートリーダー (iMark, Bio-Rad Laboratories) で 450 nm の吸光度を測定した。各実験区は Triplicate で測定した。

5. 脂肪分化誘導

SC-DFAT および IFP-DFAT を 24 ウェルプレートに 6×10^4 個/well の密度で播種し、脂肪分化誘導培地 (Mesenchymal Stem Cell Adipogenic Differentiation Medium 2 : C-28016, Promo Cell) で培養した。14 日目に、各ウェルの培地を吸引し、4%パラホルムアルデヒド (Paraformaldehyde : PFA) を加えて固定した。固定後、60% Oil red O 染色液を加えた。その後、染色液を吸引および SQ 水で洗浄し、実体顕微鏡 (VB-7000, Keyence) で撮影した。Oil

red O 染色後に、ウェルを乾燥させ、イソプロピルアルコール 100 μ l/well を加えた。その後、マイクロプレートリーダー (iMark) を用いて 490 nm の吸光度を測定した。定量値は、2 ウェルの吸光度を平均し、イソプロピルアルコールのみを加えたブランクの値を引いた値を用いて評価した。

6. 骨分化誘導

SC-DFAT および IFP-DFAT を 24 ウェルプレートに 6×10^4 個/well の密度で播種し培養し、骨分化誘導培地 (Mesenchymal Stem Cell Osteogenic Differentiation Medium : C-28013, Promo Cell) で培養した。14 日目に、各ウェルの培地を吸引し、4 % PFA を加えて固定した。固定後、1 % Alizarin red S 染色液を加えた。その後、染色液を吸引および SQ 水で洗浄し、実体顕微鏡 (VB-7000) で撮影した。Alizarin red S 染色強度の定量法は、Gregory^[9]らの方法を改変して行った。各ウェルに、10 % 酢酸を 250 μ l/well 加えて、室温で 30 分間振盪後、セルスクレーパーを用いて細胞を回収した。85°C で 10 分間加熱後、遠心分離 (20,000 \times g、15 分間) し、上清を採取した。5 % アンモニア水 (pH 4.1-4.5) 50 μ l を加え、96 ウェルプレートに移し、マイクロプレートリーダー (iMark) を用いて 405 nm の吸光度を測定した。

7. 軟骨分化誘導

軟骨分化誘導に関しては、既報^[10]の Pellet 培養法を改変して行った。SC-DFAT および IFP-DFAT を、軟骨分化誘導培地 (NH Chondrodifff Medium, Miltenyi Biotec) 2 ml の入った 15 ml ポリプロピレンチューブ (BD Falcon) 内に 5×10^5 個/tube の密度で調整した。その後、500 \times g、10 分間、遠心操作を行い、細胞を沈降させた後、インキュベーター内 (37°C、5 % CO₂) で培養した。以降、3 日毎に培地交換を行った。誘導 21 日後、培地を全て吸引した後、4 % PFA 1 ml を入れ固定した。その後、PFA を吸引し、SQ 水 1 ml で洗浄した。誘導された軟骨様細胞塊は、実体顕微鏡 (VB-7000) で観察し写真撮影した。軟骨様細胞塊の重量は、電子分析天びん (AEG-45SM, Shimazu) を用いて測定した。

8. 組織学的検討

TKA 施行時に摘出された膝蓋下脂肪体は、生理食塩水で洗浄後、10 % 緩衝ホルマリン溶液 (Wako) を用いて固定した。パラフィン包埋後、5 μ m 切片標本を作製し、脱パラフィン後、Elastica van Gieson (EVG) 染色を行った。固定した軟骨様細胞塊は、パラフィン包埋後に 4 μ m 厚で薄切した。脱パラフィン後、切片標本を、各々、HE 染色、Toluidine Blue 染色、Alcian Blue 染色、Safranin

O染色した。免疫組織化学的検討として、Aggrecan に対する免疫染色を行った。まず、25 µg/ml Hyaluronidase を用いて、37°C、30 分間、抗原賦活化を行った。次に、非特異的結合をブロックした後、切片をウサギ抗ヒト Aggrecan 抗体 (100 倍希釈, 13880-1-AP, Proteintech) を 4°C で一晩作用させた。二次抗体として、パーオキシダーゼ結合抗ウサギ IgG 抗体 (EnVision + Single Reagents, Dako) を反応させ、発色基質として、3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) を用いて発色した。作製した標本は、正立顕微鏡 (BX51, Olympus) で観察し、顕微鏡デジタルカメラ (DP20-5, Olympus) を用いて写真撮影した。

9. リアルタイム Reverse Transcription PCR (RT-PCR) 解析

TaqMan プローブを用いたリアルタイム RT-PCR 法を用いて評価した。まず、Isogen RNA Extraction kit (Nippon Gene) を用いて細胞から Total RNA を抽出した。次に、TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0 (Takara Bio) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を得た。そして、TaqMan プライマー/プローブとして、*SOX-9* (Hs00165814_ml)、*COL2A1* (Hs00194197_ml)、*PPAR γ* (Hs00234592_ml)、*AdipoQ* (Hs00605917_ml)、*Leptin* (Hs00174877_ml)、*Glut4* (Hs00168966_ml) を用いた (以上、Applied Biosystems)。PCR 反応は ABI Prism 7300 (Applied Biosystems) を用いて、95 分/10 分加温の後、95 分/15 秒と 60 分/1 分のサイクルを 40 サイクル行った。18S rRNA (Hs99999901_s1, Applied Biosystems) を同様に測定し、内部標準とした。各サンプルは triplicate で測定し、18S rRNA に対する相対的定量解析 (Comparative CT 法) を行った。

10. 統計解析

統計解析は Graph Pad Prism ソフトウェア (Version 5, MDF) を用いて行った。リアルタイム RT-PCR 解析の結果は、Mean \pm Standard Error でグラフに表記した。群間比較には Mann-Whitney U test を使用し、 $p < 0.05$ を統計学的有意差ありと判定した。

《結果》

1. 膝蓋下脂肪体の組織学的検討

膝蓋下脂肪体は、結合組織から成る隔壁で分画された大小不同の小葉から構成されていた。隔壁の厚みは、厚い部位と薄い部位が混在しており、その内部には、血管が豊富に発達していた。隔壁の一部は、EVG 染色で黒色に染色される

弾性線維の存在が認められた。小葉内部は、単胞性の白色脂肪細胞で占められていた。

2. 膝蓋下脂肪体由来 DFAT (IFP-DFAT) の調製

培養 2 日後、フラスコ天井面に成熟脂肪細胞の付着を認めた。培養 7 日後、成熟脂肪細胞から非対称性に分裂し、紡錘形の線維芽細胞様の形態を示す DFAT の出現を認めた。その後、DFAT は活発に増殖を続け、培養 13 日後にはサブコンフルエントに到達した。膝蓋下脂肪体から単離した脂肪細胞は、皮下脂肪から単離した脂肪細胞と比べて、天井培養過程における細胞の形態変化や産生された DFAT コロニーの形態に明らかな違いは認められなかった。また、IFP-DFAT は 8 代以上、明らかな形態学的異常を示さず継代培養が可能であった。

3. IFP-DFAT の形質解析

SC-DFAT と同様に、IFP-DFAT も MSC の Minimal criteria^[3]に合致する表面抗原発現プロファイルを示すことを確認した。

4. IFP-DFAT の細胞増殖能

培養 4 日目には、SC-DFAT 群に比べ、IFP-DFAT 群で細胞数が増加する傾向が認められた。培養 7 日目には、その差が顕著となり、SC-DFAT 群に比べ IFP-DFAT 群で有意 ($p < 0.05$) に細胞数が高値を示した。

5. IFP-DFAT の脂肪分化能

IFP-DFAT、SC-DFAT 共に、ウェル全体に渡って、びまん性に Oil red O 陽性を示した。Oil red O 染色強度の定量評価は、両群とも同等の染色強度を示し、明らかな違いは認められなかった。また、*PPAR γ* 、*AdipoQ*、*Leptin*、*Glut4* の遺伝子発現に関して、両群間に明らかな差異は認めなかった。

6. IFP-DFAT の骨分化誘導

骨分化誘導 14 日目の Alizarin red S 染色像では、IFP-DFAT、SC-DFAT 共に、びまん性に陽性を示した。Alizarin red S 染色強度の定量評価を行った結果、両群間に統計学的な有意差は認められなかった。

7. IFP-DFAT の軟骨分化誘導

両 DFAT とともに、直径 1.5-2.0 mm の軟骨様細胞塊の形成を認めた。同一患者に由来する軟骨様細胞塊の重量を定量評価した結果、個体差は認めるものの検討した全ての症例において、IFP-DFAT から誘導された軟骨様細胞塊の重量は、SC-DFAT から誘導された軟骨様細胞塊の重量よりも重かった。一方、両群間に統計学的有意差は認めなかった。また、軟骨様細胞塊の HE 染色、Toluidine Blue

染色、Alcian Blue 染色、Safranin O 染色、Aggrecan の免疫染色のいずれにおいても IFP-DFAT の方が強い染色像を認める傾向にあった。また、遺伝子発現に関して、*SOX-9* は両者間に有意差は認めなかった。II 型コラーゲン (*COL2A1*) では、SC-DFAT に比べ IFP-DFAT では、有意 ($p < 0.05$) に高値を示した。

《考察》

IFP-DFAT は SC-DFAT と同様に MSC に類似した形質と機能を有する細胞であることが確認できた。細胞増殖能を比較した結果、IFP-DFAT は SC-DFAT より培養 4 日目には細胞数の増加が認められ、培養 7 日目には有意に増加した。このアッセイにおいて細胞播種後、接着性を獲得するまで増殖能を発揮できないことを考えると、この結果は、両細胞が元々異なる性質を有することが示唆される。膝蓋下脂肪体には血管が豊富に存在しており、また、OA 患者の膝蓋下脂肪体には、マクロファージ、リンパ球、顆粒球などの血球成分が多く浸潤し、Basic fibroblast growth factor (bFGF)、Vascular endothelial growth factor (VEGF)、Tumor Necrosis factor α (TNF- α)、Interleukin-6 (IL-6) といったサイトカインが分泌されていることが明らかになっている^[11]。bFGF などの成長因子は軟骨細胞も含めた細胞増殖、分化作用を有す^[12,13]ことが示されている。また、OA 膝の関節液から得られる MSC のコロニー数は、軟骨変性や軟骨損傷の程度が重度になるに伴い増加する^[14]との報告がある。このように、OA に伴う膝蓋下脂肪体内の炎症性サイトカインや膝関節内圧の増加などのメカニカルストレスの影響で、膝蓋下脂肪体に存在する成熟脂肪細胞は、細胞増殖に関して有利な環境に暴露されていた可能性が考えられる。このため、SC-DAFT に比べ IFP-DFAT の方がより高い増殖能を獲得した可能性が推察される。両細胞間の今後の検討として、MSC 移植の際の早期効果発現や効率性を比較するため、両者のコロニー形成能 (Colony forming unit-fibroblasts : CFU-F) を測定し、自己複製能を評価することや、長期継代培養による細胞集団倍加数 (Population doubling level) などを測定し、細胞老化の差異を評価することが必要である。

両細胞の軟骨分化能に関しては、Pellet 培養法により球形を呈した分化度の高い軟骨様細胞塊を誘導することができた。Pellet 培養法では細胞の増殖は休止しており、誘導される軟骨様細胞塊の重量増加は、主に細胞から分泌される細胞外基質量を反映することが知られている。軟骨様細胞塊の重量に個体差が

認められる原因として、軟骨基質の分泌能が異なる細胞集団が混在していることなどが推測される。今後は軟骨様細胞塊のプロテオグリカン/DNA 比などを測定し、細胞数の影響を除外した軟骨分化能の定量的評価を行うことも必要と考える。

軟骨様細胞塊の組織学的検討から、両細胞とも酸性ムコ多糖類の産生や軟骨特異的プロテオグリカンである **Aggrecan** の発現が認められた。その発現強度は、**SC-DFAT** より **IFP-DFAT** の方が強く、また、その局在は表層近くで優位であった。**SC-DFAT** と **IFP-DFAT** 間で、軟骨分化を起こす細胞に局在の違いがあることは興味深い所見である。**IFP-DFAT** で軟骨細胞が表層部に多く局在することは、軟骨様細胞塊を移植に用いる場合、周辺軟骨組織との接着性や癒合性が高まり、**SC-DFAT** に比べ高い治療効果を示すことが期待できる。**MSC** の軟骨分化には液性因子による刺激とともに低酸素による刺激が関与することが知られている。液性因子による影響は表層に現れやすく、低酸素における影響は中心部に現れやすいと考えられる。**SC-DFAT** と **IFP-DFAT** では、これらの刺激に対する反応性が異なるのかもしれない。今後、軟骨分化促進作用が報告^[15]されている **TGF- β** や **IGF-1** などの液性因子を添加し、両細胞の反応性の違いを比較検討する実験などが望まれる。硝子軟骨の細胞外基質の主成分である II 型コラーゲン遺伝子 (**COL2A1**) の発現は、**IFP-DFAT** 群の方が **SC-DFAT** 群よりも有意に高かった。

以上の結果から、**IFP-DFAT** の方が **SC-DFAT** に比べ軟骨分化指向性、特に、硝子軟骨への分化能が高いことが示された。**IFP-MSC** は **ASC** や骨髄 **MSC** に比べ軟骨分化能が良好であると報告されている^[16, 17]。これらの所見を合わせて考えると膝蓋下脂肪体に由来する間葉系細胞は共通の軟骨分化指向性を有することが示唆される。関節内組織である滑膜や半月板に由来する **MSC** は、関節外組織である骨髄、筋肉、脂肪由来の **MSC** よりも、軟骨細胞の遺伝子プロファイルに近似していることが報告されている^[18]。両者はその起源が異なり、関節内組織由来 **MSC** は、より軟骨前駆細胞に近い形質を有していることが示唆される。関節内組織で滑膜組織に近接する膝蓋下脂肪体に由来する **MSC** や **DFAT** も、同様に軟骨前駆細胞に近い形質を有している可能性がある。

DFAT は、成熟脂肪細胞を脂肪組織から単離後、調製される細胞であるため、均一性が高い。一方、**ASC** は脂肪組織の間質血管分画を付着培養して調製

される細胞であるため、血液細胞などの混入が多いことが報告されている^[8, 19]。OA 患者の膝蓋下脂肪体組織には炎症性細胞の浸潤が多く認められ、Matrix metalloproteinase (MMP) などの分泌を介して、OA の病態進行を促進する可能性が指摘されている^[20]。さらに、OA 膝蓋下脂肪体に浸潤した常在性マクロファージは、MSC の軟骨分化に対し抑制的に作用することが報告されている^[21]。従って、IFP-DFAT に比べ、IFP-ASC は混入する血液細胞の影響により、その軟骨分化能や OA に対する治療効果が低下する可能性がある。また、DFAT は MMP を阻害する Tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP) を発現する^[22]ことが報告されており、MMP による OA の病態進行を抑制する効果が期待できる。今後、IFP-DFAT と IFP-ASC の *in vitro* における軟骨分化能や軟骨欠損動物モデルを用いた軟骨再生効果を比較検討し、両者の性能差を明らかにすることが望まれる。

《結論》

皮下脂肪と同様に膝蓋下脂肪体からも DFAT の調製が可能であった。IFP-DFAT は SC-DFAT と同様に、MSC 様の形質を示し、軟骨、脂肪、骨への多分化能を示した。IFP-DFAT は SC-DFAT に比べ、高い細胞増殖能と軟骨分化指向性を示すことが明らかとなった。以上の結果より、IFP-DFAT は軟骨再生に用いられる治療用細胞源として有望であると考えられた。

《引用文献》

- [1] J.A. Buckwalter, H.J. Mankin, Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation, Instr. Course Lect. 47 (1998) 487-504.
- [2] H.J. Mankin, The response of articular cartilage to mechanical injury, J. Bone Joint Surg. Am. 64 (1982) 460-466.
- [3] M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller, et al., Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement, Cytotherapy 8 (2006) 315-317.
- [4] J.L. Dragoo, B. Samimi, M. Zhu, et al., Tissue-engineered cartilage and bone using stem cells from human infrapatellar fat pads, J. Bone Joint Surg. Br. 85 (2003) 740-747.

- [5] E. Lopez-Ruiz, M. Peran, J. Cobo-Molinos, et al., Chondrocytes extract from patients with osteoarthritis induces chondrogenesis in infrapatellar fat pad-derived stem cells, *Osteoarthritis Cartilage* 21 (2013) 246-258.
- [6] P. Hindle, N. Khan, L. Biant, et al., The Infrapatellar Fat Pad as a Source of Perivascular Stem Cells with Increased Chondrogenic Potential for Regenerative Medicine, *Stem Cells Transl Med* 6 (2017) 77-87.
- [7] K. Yagi, D. Kondo, Y. Okazaki, et al., A novel preadipocyte cell line established from mouse adult mature adipocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 321 (2004) 967-974.
- [8] T. Matsumoto, K. Kano, D. Kondo, et al., Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential, *J. Cell. Physiol.* 215 (2008) 210-222.
- [9] CA. Gregory, WG. Gunn, A. Peister, et al., An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction, *Anal Biochem.* 329 (2004) 77-84.
- [10] M.F. Pittenger, A.M. Mackay, S.C. Beck, et al., Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells, *Science* 284 (1999) 143-147.
- [11] T. Ushiyama, T. Chano, K. Inoue, et al., Cytokine production in the infrapatellar fat pad: another source of cytokines in knee synovial fluids, *Ann. Rheum. Dis.* 62 (2003) 108-112.
- [12] T. Fujisato, T. Sajiki, Q Liu, et al., Effect of basic fibroblast growth factor on cartilage regeneration in chondrocyte-seeded collagen sponge scaffold, *Biomaterials.* 17 (1996) 155-162.
- [13] Y. Kato, M. Iwamoto, T. Koike, et al., Fibroblast growth factor stimulates colony formation of differentiated chondrocytes in soft agar, *J Cell Physiol.* 133 (1987) 491-498.
- [14] I. Sekiya, M. Ojima, S. Suzuki, et al., Human mesenchymal stem cells in synovial fluid increase in the knee with degenerated cartilage and osteoarthritis, *J Orthop Res.* 30 (2012) 943-949.

- [15] H.J. Kim, G.I. Im, et al., Chondrogenic differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: greater doses of growth factor are necessary, *J Orthop Res.* 27 (2009) 612-619.
- [16] J. Garcia, C. Mennan, H.S. McCarthy, et al., Chondrogenic Potency Analyses of Donor-Matched Chondrocytes and Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow, Infrapatellar Fat Pad, and Subcutaneous Fat, *Stem Cells Int* 2016 (2016) 6969726.
- [17] P. Tangchitphisut, N. Srikaew, S. Numhom, et al., Infrapatellar Fat Pad: An Alternative Source of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells, *Arthritis* 2016 (2016) 4019873.
- [18] Y. Segawa, T. Muneta, H. Makino, et al., Mesenchymal stem cells derived from synovium, meniscus, anterior cruciate ligament, and articular chondrocytes share similar gene expression profiles, *J Orthop Res.* 27 (2009) 435-441.
- [19] S. Kono, T. Kazama, K. Kano, et al., Phenotypic and functional properties of feline dedifferentiated fat cells and adipose-derived stem cells, *Vet. J.* 199 (2014) 88-96.
- [20] S. Clockaerts, Y.M. Bastiaansen-Jenniskens, J. Runhaar, et al., The infrapatellar fat pad should be considered as an active osteoarthritic joint tissue: a narrative review, *Osteoarthritis Cartilage* 18 (2010) 876-882.
- [21] W. Wei, E. Rudjito, N. Fahy, et al., The infrapatellar fat pad from diseased joints inhibits chondrogenesis of mesenchymal stem cells, *Eur Cell Mater* 30 (2015) 303-314. *Orthop Res.* 27 (2009) 435-441.
- [22] S. Kikuta, N. Tanaka, T. Kazama, et al., Osteogenic effects of dedifferentiated fat cell transplantation in rabbit models of bone defect and ovariectomy-induced osteoporosis, *Tissue Eng Part A* 19 (2013) 1792-1802.